

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 25 APR 2003

WIPO

PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

102 61 435.0

Anmeldetag:

28. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber:

Curacyte AG, München/DE

Bezeichnung:

Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und
Verwendung

IPC:

C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 5. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wenner

Curacyte AG

30. Dezember 2002
C37296B BÖ/Boh

Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft neue Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und
5 Verwendung zur Therapie, Prophylaxe und Diagnose eines Tumors.

Die Ausbreitung und Metastasierung solider Tumoren in umgebendem Gewebe
wird durch ihr Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix in der Umgebung der Tumor-
zelle abzubauen bzw. die Basalmembran zu durchdringen, ermöglicht. In diesem
10 Prozess kommt neben verschiedenen Matrixmetalloproteinasen und Cathepsinen
vor allem dem Plasminogenaktivator Urokinase (uPA) eine zentrale Bedeutung zu
(P. Mignatti und D.B. Rifkin, Physiol. Rev. 73, 161-195, 1993). So bewirkt uPA
die Aktivierung von Plasminogen; das entstehende Plasmin kann die Komponen-
ten der extrazellulären Matrix (Fibrin, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane u.a.)
15 abbauen sowie Metalloproteasen und pro-Urokinase zu uPA aktivieren (U.
Reuning et al., Int. J. Oncol. 13, 893-906, 1998).

Sowohl pro-Urokinase als auch uPA binden an den uPA-Rezeptor (uPAR), einen
an der Zelloberfläche lokalisierten, spezifischen Rezeptor. Dadurch wird eine
20 Verstärkung und Fokussierung der Aktivität von uPA und damit der Plasmino-
genaktivierung in der direkten Umgebung der Tumorzelle erreicht. Sowohl in
zellbiologischen Studien als auch in Tiermodellen konnte die Bedeutung dieses
zellassozierten Plasminogenaktivator-Systems für Tumorstadium und -
ausbreitung gezeigt werden. So wird das invasive Potential von Tumorzellen bei
25 Hemmung der enzymatischen Aktivität von uPA durch die natürlichen Inhibitoren
PAI-1 und PAI-2 herabgesetzt (J.-F. Cajot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87,
6939-6943, 1990; M. Baker et al., Cancer Res. 50, 4876-4684, 1990). In Hühner-
embryos konnte durch Zugabe von Antikörpern gegen uPA die durch menschliche

Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetastasen fast vollständig verhindert werden (L. Ossowski et al., Cell 35, 611-619, 1983).

Die Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) sind in den letzten Jahren in Hinsicht ihrer klinischen Relevanz für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht worden. Insbesondere der Gehalt von uPA im Gewebe verschiedener Tumoren erwies sich als ein Prognosefaktor. So haben Patienten mit hohem uPA-Spiegel eine schlechtere Prognose als solche mit niedriger uPA-Konzentration im Tumor (M. Schmitt et al., Thromb. Haemost. 78, 285-296, 1997; R.W. Stephens et al., Breast Cancer Res. Treat. 52, 99-111, 1998). Auch eine erhöhte Konzentrationen an uPAR im Tumorgewebe korreliert mit einer schlechten Prognose (H. Pedersen et al., Cancer Res. 54, 4671-4675, 1994; C. Duggan et al., Int. J. Cancer 61, 597-600, 1995).

Aus den Befunden zum prognostischen Wert des uPA- und uPAR-Gehaltes im Tumorgewebe kann angenommen werden, dass synthetische uPA-Inhibitoren in der Lage sind, Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Die Zahl der bisher bekannten uPA-Hemmstoffe ist allerdings relativ klein. Die Mehrzahl besitzt nur eine geringe Spezifität und Wirkungsstärke, wie es für verschiedene Benzamidin- und β -Naphthamidin-Derivate zutrifft (J. Stürzebecher und F. Markwardt, Pharmazie 33, 599-602, 1978). Das von Vassalli und Belin (FEBS Letters 214, 187-191, 1997) als uPA-Hemmstoff beschriebene Amilorid ist zwar ein spezifischer, aber schwacher Inhibitor von uPA ($K_i = 7 \mu\text{M}$).

Stärker wirksame uPA-Inhibitoren wurden mit 4-substituierten Benzothiophen-2-carboxamidinen ($K_i = 0,16 \mu\text{M}$ für Verbindung 623) gefunden. Hemmstoffe dieses Typs inaktivieren auch uPA, die an uPAR gebunden ist (M.J. Towle et al., Cancer Res. 53, 2553-2559, 1993). Die Benzothiophen-Derivate sind sehr spezifisch, ihre Hemmwirkung gegenüber Plasmin und dem Plasminogenaktivator vom

Gewebetyp (tPA) ist gering, allerdings ist die Synthese von Verbindungen dieses Typs sehr aufwändig.

5 Eine vergleichbare Spezifität haben auch 4-Aminomethylphenylguanidin-Derivative, deren Hemmwirkung gegenüber uPA ($K_i = 2,4 \mu\text{M}$ für die wirksamste Verbindung) allerdings vergleichsweise gering ist (S. Sperl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5113-5118, 2000).

10 Im Gegensatz dazu erreichen $N\alpha$ -Triisopropylphenylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-Derivate mikromolare K_i -Werte ($0,41 \mu\text{M}$ für die wirksamste Verbindung), sind allerdings sehr unspezifische uPA-Hemmstoffe, mit gleicher oder stärkerer Wirkung werden Trypsin, Thrombin und Plasmin inhibiert (J. Stürzebecher et al., Bioorg. Med. Letters 9, 3147-3152, 1999). Sehr wirksame uPA-Hemmstoffe sind in der WO 99/05096 mit weiterentwickelten β -Naphthamidinen offenbart. Es
15 werden IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich beschrieben, allerdings keine Angaben zur Selektivität und der biologischen Wirksamkeit gemacht.

Bisher wurden nur wenige Peptide als uPA-Hemmstoffe beschrieben, die sich von der Substrat-Sequenz ableiten. Kettner und Shaw (Methods in Enzymology, 80, 826-842, 1981) beschrieben Chlormethylketone, die zwar uPA irreversibel hemmen, aber nicht für in vivo-Anwendung geeignet sind.
20

In der EP 18 32 71 sind Lysin-Derivate offenbart, die eine gewisse uPA-Hemmung bewirken, allerdings auch andere vergleichbare Enzyme hemmen und damit nur sehr speziell bzw. eingeschränkt für medizinische Zwecke verwendbar
25 sind. Gleiches gilt für die in der WO 95/17 8 85 als uPA-Inhibitoren beschriebenen niedermolekularen Polypeptide (ca. 50 Aminosäuren), die sich von natürlichen Hemmstoffen ableiten. Auf Grund ihres Peptidcharakters und der Molekülgröße ist ihr in vivo-Einsatz stark eingeschränkt. In jüngster Zeit wurden in

WO 00/05 2 45 Peptidylaldehyde mitgeteilt, die C-terminal ein Arginal und in P3 ein D-Serin enthielten und uPA sehr wirksam hemmten. Nach Acylierung des Ser-Hydroxyl konnte für die Leitverbindung iBuOCO-D-Ser-Ala-Arg-H nach s.c.-Gabe eine relative Bioverfügbarkeit von 87 % beobachtet werden (S. Y. Tamura et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, 983-987, 2000). In PCT/EP WO 01/06789 werden Hemmstoffe offenbart, die sich von acyliertem Amidino-benzylamin ableiten und neben einer natürlichen Aminosäure in P2 einen D-Serin oder eine vergleichbare unnatürlichen Aminosäure enthalten. Verbindungen diese Typs hemmen Urokinase ($K_i = 36 \text{ nM}$ für die wirksamste Verbindung) sehr wirksam. Allerdings haben Verbindungen diese Typs nur unzureichende pharmakokinetische Eigenschaften für eine Anwendung in vivo; sie werden nach oraler Gabe kaum resorbiert und im Versuchstier nach i.v.-Gabe sehr schnell aus der Zirkulation eliminiert.

- 15 Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, einen auch für therapeutische Anwendungen geeigneten Wirkstoff anzugeben, der Urokinase mit hoher Aktivität hemmt und der nach i.v.- oder s.c.-Gabe möglichst lange im Körper zirkuliert.

20 Überraschend wurde gefunden, dass acyliertes Amidino-benzylamin gemäß der im Patentanspruch 1 angeführten allgemeinen Formel I, insbesondere Verbindungen des 4-Amidino-benzylamins, bei denen R_1 , Y, X, R_2 , R_3 und R_4 natürliche und/oder unnatürliche Aminosäuren ergeben, dann sowohl Urokinase sehr wirksam inaktivieren als auch insbesondere nach i.v.- oder s.c.-Gabe langsam aus der Zirkulation eliminiert werden, wenn neben der Amidinofunktion weitere geladene Gruppen vorzugsweise Carboxyl, Amino, Amidino, Hydroxyamidino, Amidrazo-
25 no oder Guanidino eingeführt werden. Die Carboxylgruppen können auch geschützt in Form ihrer Ester vorliegen, wobei bevorzugt Ethylester Verwendung finden. Diese Ester werden in vivo teilweise in die freien Säuren umgewandelt.

- 30 Besonders geeignete Verbindungen sind in den Unteransprüchen aufgeführt.

Einen bevorzugten Hemmstoff von Urokinase, der besonders langsam eliminiert wird bildet dabei Amidino-benzylamin, wenn die Amidinogruppe in 4-Position steht, als Aminosäuren Glutaminsäure und D-Serin gebunden sind und wenn die
5 Verbindung eine N-terminale Schutzgruppe R_5 aus einem Aryl- bzw. Aralkyl-sulfonyl-Rest aufweist.

Einen besonders bevorzugten Hemmstoff von Urokinase mit hoher Affinität, der ebenfalls besonders langsam eliminiert wird, bildet Amidino-benzylamin, wenn die Amidinogruppe in 4-Position steht, als Aminosäuren eine natürliche oder
10 künstliche, unsubstituierte oder substituierte basische Aminosäure, besonders bevorzugt Arginin oder Lysin, und D-Serin gebunden sind und wenn die Verbindung eine N-terminale Schutzgruppe R_5 aus einem Aryl- bzw. Aralkyl-sulfonyl-Rest aufweist.

Bei einer starken Inaktivierung von Urokinase werden die zusätzlich geladenen
15 4-Amidino-benzylamin-Derivate auf vorteilhafte und überraschende Weise sehr langsam eliminiert, so dass die erfindungsgemäßen Verbindungen eine neue Gruppe von hochaktiven Urokinase-Hemmstoffen darstellen.

Beispiele für solche Verbindungen sind neben den in den Ausführungsbeispielen genannten:

20

Benzylsulfonyl-dSer-homoLys-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-norArg-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-homoArg-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Orn-4-Amidinobenzylamid

25 Benzylsulfonyl-dSer-Orn(2-Imidazoliny)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-His-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Dab-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-4-[(2-Amino)Pyrimidinyl]Buttersäure-4-
Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Dap-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Ala[3-(2-Pyrrolidinyl)]-4-Amidinobenzylamid

5 Benzylsulfonyl-dSer-Ala[3-Pyrrolidinyl-(2-N-Amidino)]-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Ala[3-(N-Piperazine-4-N-amidino)]-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Ala(4-Pip)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Ala[4-Pip(N-amidino)]-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-homoAla(4-Pip)-4-Amidinobenzylamid

10 Benzylsulfonyl-dSer-Ala[3-Pip(N-amidino)]-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-homoAla(3-Pip)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-homoAla[4-Pip(N-amidino)]-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Ala-(3-guanidino)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Phe(3-Amidino)-4-Amidinobenzylamid

15 Benzylsulfonyl-dSer-Phe(4-Amidino)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Phe(3-NH₂)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Phe(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Phe(3-Guanidino)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Phe(4-Guanidino)-4-Amidinobenzylamid

20 Benzylsulfonyl-dSer-Phe[4-(2-imidazoliny)]-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Phe[3-CH₂-(guanidino)]-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-Phe[4-CH₂-(guanidino)]-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-homoPhe(3-Amidino)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-homoPhe(4-Amidino)-4-Amidinobenzylamid

25 Benzylsulfonyl-dSer-hPhe(3-NH₂)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-hPhe(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-hPhe(3-Guanidino)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-hPhe(4-Guanidino)-4-Amidinobenzylamid

5 Benzylsulfonyl-dSer-cis-Cha(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-trans-Cha(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-cis-homoCha(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-trans-homoCha(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid

Benzylsulfonyl-dSer-trans-Cha(4-CH₂NH₂)-4-Amidinobenzylamid

10 Benzylsulfonyl-dSer-trans-homoCha(4-CH₂NH₂)-4-Amidinobenzylamid

Die Verbindungen liegen in der Regel als Salze, vorzugsweise mit Mineralsäuren, bevorzugt als Hydrochloride, vor oder vorzugsweise als Salze mit geeigneten organischen Säuren.

15

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in prinzipiell bekannter Weise, wie nachfolgend beschrieben, beispielsweise wie folgt hergestellt werden:

20 Aus dem kommerziell erhältlichen 4-Cyanobenzylamin (Showa Denko, Japan) wird das Boc-geschützte 4-Acetyloxamidinobenzylamin nach dem Fachmann bekannten Verfahren gewonnen. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt die Ankopplung der weiteren Aminosäuren und der Schutzgruppe R₅ mittels Standardkopplungsmethoden mit Boc als N-terminaler Schutzgruppe. Die zweite Aminosäure kann auch direkt als N-aryl- bzw. N-aralkyl-sulfonyl-geschützte

25 Aminosäure gekoppelt werden. Die Peptidanaloga werden sequentiell, beginnend vom Acetyloxamidino-benzylamin, aufgebaut. Die meisten Zwischenprodukte kristallisieren gut und lassen sich damit einfach reinigen. Die Endreinigung der

Hemmstoffe erfolgt auf der letzten Stufe vorzugsweise über präparative, reversed-phase HPLC.

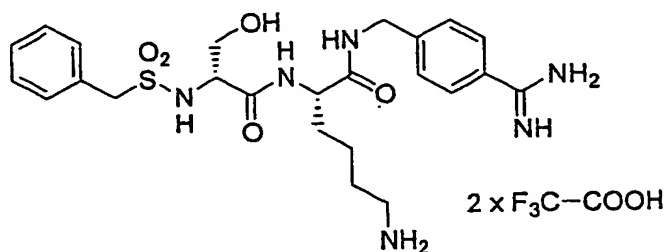
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend einen erfindungsgemäßen Hemmstoff sowie weitere pharmazeutisch geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, die z.B. der Stabilisierung und/oder Konservierung des Arzneimittels dienen, sind dem Fachmann allgemein geläufig (z.B. Sucker H. et al., (1991) Pharmazeutische Technologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart). Hierzu zählen beispielsweise physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Ringer-Laktat, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder inerte Gase.

Das Arzneimittel könnte beispielsweise in parenteraler Anwendungsform, insbesondere in intraartikler, intravenöser, intramuskulärer oder subcutaner Form, in enteraler Anwendungsform, insbesondere zur oralen oder rektalen Anwendung, oder in topischer Anwendungsform, insbesondere als Dermatikum, angewendet werden. Bevorzugt sind intravenöse oder subkutane Anwendungen.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird das Arzneimittel beispielsweise in Form einer Tablette, eines Dragées, einer Kapsel, eines Pellets, Suppositoriums, einer Lösung, insbesondere einer Injektions- oder Infusionslösung, von Augen-, Nasen und Ohrentropfen, eines Safts, einer Kapsel, einer Emulsion oder Suspension, eines Globuli, Styli, Aerosols, Puders, einer Paste, Creme oder Salbe eingesetzt.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von zwei Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne sie zu beschränken:

Beispiel 1: Benzylsulfonyl-dSer-Lys-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA



5

1a) Boc-Lys(Tfa)-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid

5 g (14,61 mmol) Boc-Lys(Tfa)-OH wurden in 100 ml THF gelöst und bei -15 °C mit 1,767 ml (16,10 mmol) NMM und 1,899 ml (14,61 mmol) CKIBE versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei -15°C gerührt, dann wurden 3,74 g (15,33 mmol) 4-(Acetyloxamidino)Benzylamin x HCl (hergestellt wie in WO 01/96286 A2 beschrieben) und nochmals 1,767 ml (16,10 mmol) NMM hinzugefügt. Der Ansatz wurde eine weitere Stunde bei -15 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Ansatz in Essigester aufgenommen und jeweils 3 x mit 5 % KHSO₄, NaCl-gesättigtem Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und nochmals mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt aus Essigester kristallisiert.

Ausbeute: 6,82 g (12,83 mmol) weiße Kristalle, HPLC: 43,87 % B

1b) H-Lys(Tfa)-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid x HCl

5 g (9,41 mmol) Boc-Lys(Tfa)-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid wurden in wenig Eisessig angelöst und anschliessend mit 100 ml 1 N HCl in Eisessig versetzt. Nach 45 min Stehen bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel teilweise eingengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und

nochmals mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 4,65 g (10,78 mmol) weißer Feststoff, HPLC: 25,52 % B

5 1c) Bzls-dSer(tBu)-Lys(Tfa)-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid

1,93 g (6,107 mmol) Bzls-dSer(tBu)-OH und 3 g (6,412 mmol) H-Lys(Tfa)-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid x HCl wurden in 30 ml Acetonitril gelöst und bei 0 °C mit 3,337 g (6,412 mmol) PyBop und 3,187 ml (18,32 mmol) DIEA versetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 0 °C und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und jeweils 3 x mit 5 % KHSO₄, NaCl-gesättigtem Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und nochmals mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Es verblieb ein leicht gelbes, amorphes Rohprodukt, das ohne
10 weitere Reinigung direkt für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt wurde.
15

Ausbeute: 5,88 g (Rohprodukt), HPLC: 52,93 % B

1d) Bzls-dSer(tBu)-Lys(Tfa)-4-(Amidino)Benzylamid x Acetat

5,88 g (Rohprodukt) Bzls-dSer(tBu)-Lys(Tfa)-4-(Acetyloxamidino) Benzylamid wurden in 150 ml 90 % Essigsäure gelöst, dazu wurden 500 mg Katalysator (10 % Pd/C) gegeben. Der Ansatz wurde 6 h bei Raumtemperatur und Normaldruck mit Wasserstoff hydriert. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel teilweise eingeeengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und nochmals mit Diethylether gewaschen. Der weisse, kristal-
20 line Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet.
25

Ausbeute: 4,36 g (5,962 mmol), HPLC: 43,50 % B.

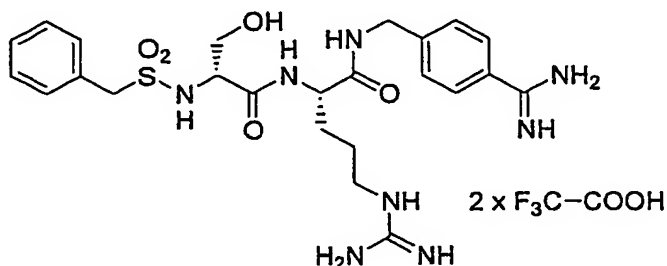
1e) Bzls-dSer-Lys-4-(Amidino)Benzylamid x 2 TFA

0,2 g Rohprodukt an Bzls-dSer(tBu)-Lys(Tfa)-4-(Amidino)Benzylamid x Acetat wurden unter Eiskühlung mit 5 ml 1M wässriger Piperidinlösung versetzt und 3 h gerührt. Anschliessend wurden 45 ml TFA zugegeben. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt, mit Toluol versetzt und das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt. Dieser Vorgang wurde noch 2 x wiederholt. Der verbleibende Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung mit präparativer reversed-phase HPLC gereinigt.

Ausbeute: 65 mg, HPLC: 21,19 % B

MS: berechnet 574,26 (monoisotopic), gefunden 574,3 $[M+H]^+$

Beispiel 2: Benzylsulfonyl-dSer-Arg-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA



2a) Boc-Arg(Boc)₂-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid

0,5 g (1,05 mmol) Boc-Arg(Boc)₂-OH wurden in 25 ml THF gelöst und bei -15 °C mit 122 µl (1,11 mmol) NMM und 137 µl (1,05 mmol) CKIBE versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei -15 °C gerührt, dann wurden 0,274 g (1,11 mmol) 4-(Acetyloxamidino)Benzylamin x HCl (hergestellt wie in WO 01/96286 A2 beschrieben) und nochmals 122 µl (1,11 mmol) NMM hinzugefügt. Der Ansatz wurde eine weitere Stunde bei -15 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Ansatz in Essigester aufgenommen und jeweils 3 x mit 5 % KHSO₄, NaCl-gesättigtem Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und nochmals mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, wobei das Produkt als weisse, amorphe Substanz anfiel.

Ausbeute: 0,654 g (0,985 mmol), HPLC: 48,89 % B

2b) H-Arg-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid x HCl

0,65 g (0,979 mmol) Boc-Arg(Boc)₂-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid wurden in
5 wenig Eisessig angelöst und anschliessend mit 100 ml 1 N HCl in Eisessig ver-
setzt. Nach 45 min Stehen bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel teilweise
eingengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und
nochmals mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde im Vakuum getrock-
net.

10 Ausbeute: 0,459 g (0,971 mmol) weißer Feststoff, HPLC: 17,01 % B

2c) Bzls-dSer(tBu)-Arg-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid

0,2 g (0,634 mmol) Bzls-dSer(tBu)-OH und 0,3 g (0,634 mmol) H-Arg-
4-(Acetyloxamidino)Benzylamid x HCl wurden in 30 ml DMF gelöst und bei
15 0 °C mit 0,33 g (0,634 mmol) PyBop und 331 µl (1,902 mmol) DIEA versetzt.
Der Ansatz wurde 30 min bei 0 °C und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt.
Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester auf-
genommen und jeweils 2 x mit 5 % KHSO₄, mit NaCl-gesättigtem Wasser gewa-
schen und anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Va-
20 kuum entfernt. Es verblieb ein leicht gelbes Öl, das direkt für den nächsten Syn-
theseschritt eingesetzt wurde.

Ausbeute: 0,724 g (Öl), HPLC: 38,88 % B

2d) Bzls-dSer(tBu)-Arg-4-(Amidino)Benzylamid x 2 Acetat

25 0,724 g (Rohprodukt) Bzls-dSer(tBu)-Arg-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid wur-
den in 30 ml 90 % Essigsäure gelöst, dazu wurden 100 mg Katalysator (10 %
Pd/C) gegeben. Der Ansatz wurde 6 h bei Raumtemperatur und Normaldruck mit
Wasserstoff hydriert. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert, das Lö-

sungsmittel teilweise eingeengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und nochmals mit Diethylether gewaschen. Der weisse, kristalline Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,367 g (0,508 mmol), HPLC: 31,66 % B.

5

2e) Bzls-dSer-Arg-4-(Amidino)Benzylamid x 2 TFA

140 mg (0,194 mmol) Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-(Amidino)-Benzylamid x 2 AcOH wurden mit 5 ml 90 % TFA versetzt. Der Ansatz wurde 60 min bei Raumtemperatur belassen, anschliessend das Lösungsmittel teilweise eingeengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und nochmals mit Diethylether gewaschen. Der weisse, kristalline Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet und mit präparativer reversed-phase HPLC gereinigt.

10

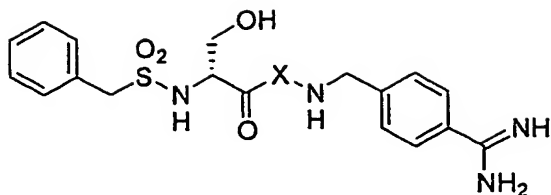
Ausbeute: 74 mg (0,055 mmol) HPLC: 22,15 % B

MS: berechnet 546,65 (monoisotopic), gefunden 547,34 $[M+H]^+$

15

Analytische HPLC

Shimadzu LC-10A System, Säule: Vydac C₁₈, 5 µm (250 x 4 mm) Lösungsmittel B: 0,1 % TFA in ACN, Gradient: 10 % B bis 60 % B in 50 min, 1 ml/min Fluß, Detektion bei 220 oder 215 nm.



X	K _i (μM)				t _{1/2} (h)
	uPA	Plasmin	Trypsin	Thrombin	
Lys	0,024	0,36	0,0068	4,3	0,7
Arg	0,0089	0,2	0,007	4,7	0,6

Tabelle 1: Hemmkonstanten (K_i in μM) und Halbwertszeiten (t_{1/2} in h) der Elimination (β-Phase) in Ratten nach intravenöser Gabe von 1 mg/kg für Inhibitoren der allgemeinen Struktur. Die Bestimmung der Konstanten Hemmkonstanten (K_i und t_{1/2}) erfolgte für uPA wie in Stützebecher et al., (1997) Vol. 40, 3091-3099 beschrieben und für Plasmin, Trypsin und Thrombin analog hierzu.

Verwendete Abkürzungen:

Ac	Acetyl
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
Bzl	Benzyl
Bzls	Benzylsulfonyl
Cha	β-Cyclohexylalanin
CKIBE	Chlorkohlensäureisobutylester
CMe	Cyclohexylmethyl
Dab	α,γ-Diaminobuttersäure
Dap	α,β-Diaminopropionsäure
DIEA	Diisopropylethylamin

	DMF	N,N-Dimethylformamid
	dSer	D-Serin
	iBu	iso-butyl
	i.V.	im Vakuum
5	NMM	N-Methylmorpholin
	PyBOP	Benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluoro- phosphat
	TEA	Triethylamin
	TFA	Trifluoressigsäure
10	Tfa	Trifluoracetyl
	THF	Tetrahydrofuran

Curacyte AG

30. Dezember 2002
C37296B BÖ/Boh

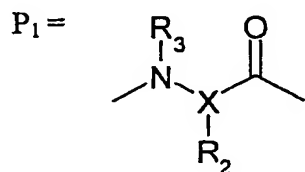
Patentansprüche

1. Verbindung der allgemeinen Formel I

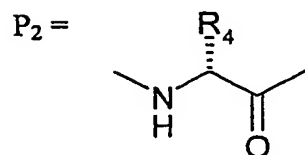


wobei

10 A P_2-P_1 mit



und



ist;

25 R_1 H oder $-(CH_2)_aCOOR_6$ mit $a = 0, 1, 2, 3, 4$ oder 5 , vorzugsweise mit $a = 0, 1$ oder 2 , ist, wobei R_6 ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 3 C-Atomen, vor allem Ethyl, ist;

R_2 ein H, ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 8 C-Atomen vorzugsweise mit 1 bis 3 C-Atomen, oder

$-(CH_2)_cCOOR_8$ mit $c = 1, 2, 3$ oder 4 , wobei R_8 H oder ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 3 C-Atomen, vor allem Ethyl, ist oder

$-(CH_2)_d-OR_9$ mit $d = 1, 2, 3$ oder 4 , wobei R_9 H ist, oder

5 $-(CH_2)_eOR_{10}$, $-(CH_2)_eSR_{10}$, $-(CH_2)_e$ -Guanidino, $-(CH_2)_e$ -Imidazol oder $-(CH_2)_eNHR_{10}$ mit $e = 1, 2, 3, 4$ oder 5 ist, wobei R_{10} ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1-16, insbesondere 1-8, vor allem 1-3 C-Atomen oder ein substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest ist, wobei der Alkylrest vorzugsweise 1 bis 16, insbesondere 1 bis 8, vor allem 1 bis 3 C-Atome, und der Aryl- oder Heteroarylrest vorzugsweise 4 bis 14, insbesondere 6 bis 10, vor allem 6 C-Atome und vorzugsweise 1 bis 3 N als Heteroatom besitzt, oder

15 $-(CH_2)_kO-CO-OR_{16}$ mit $k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 ist, wobei R_{16} ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4, vor allem 1-2 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl-, ein Campher-, ein Cyclohexylmethylrest, vorzugsweise Benzyl, ist;

20 R_3 H oder $-(CH_2)_bR_7$ mit $b = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , vorzugsweise mit $b = 2$ oder 3 , ist, wobei R_7 H, ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 10 C-Atomen, vorzugsweise mit 1 bis 3 C-Atomen, oder ein geladener Rest, vorzugsweise einer $-(CH_2)_jCOOR_{13}$, $-(CH_2)_jSO_2R_{13}$, $-(CH_2)_jNH_2$, $-(CH_2)_j$ -Amidino-, $-(CH_2)_j$ -Hydroxyamidino- oder $-(CH_2)_j$ -Guanidino-Gruppe mit $j = 0, 1$ oder 2 ist, wobei R_{13} H oder ein Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 4, vor allem Ethyl, ist;

25 R_4 ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 8, vorzugsweise 1 bis 3, C-Atomen, $-(CH_2)_fOR_{11}$, $-(CH_2)_fSR_{11}$, oder $-(CH_2)_fNHR_{11}$ mit $f = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 ist, wobei R_{11} H oder $-CO-OR_{17}$ ist, wobei R_{17} ein

verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4, vor allem 1-2 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl-, ein Campher-, ein Cyclohexylmethylrest, vorzugsweise Benzyl, ist;

5

R_5 $-(CH_2)_g(CH_3)_h$, $-(CH_2)_i$ -Aryl mit $g + h = i = 0, 1, 2$ oder 3 , $-SO_2R_{12}$, $-COR_{12}$, oder $-COOR_{12}$ ist, wobei R_{12} ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl-, ein Campher-, ein Cyclohexylmethylrest, vorzugsweise Benzyl, ist;

10

wobei R_5 mit einer geladenen oder ungeladenen Gruppe, vorzugsweise einer $-(CH_2)_jCOOR_{13}$, $-(CH_2)_jSO_2R_{13}$, $-(CH_2)_jNH_2$, $-(CH_2)_j$ -Amidino-, $-(CH_2)_j$ -Hydroxyamidino- oder $-(CH_2)_j$ -Guanidino-Gruppe mit $j = 0, 1$ oder 2 modifiziert sein kann, wobei R_{13} H oder ein Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere Ethyl, ist;

15

U ein Phenyl- oder Cyclohexylrest ist oder ein Heterophenyl- oder Heterocyclohexylrest mit vorzugsweise mindestens einem N, S oder O als Heteroatom, insbesondere Pyridin, Piperidin oder Pyrimidin, ist;

20

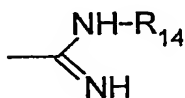
V $(CH_2)_n$ mit $n = 0, 1, 2$ oder 3 , vorzugsweise 0 , ist;

X N oder CH, vorzugsweise CH, ist;

Y N oder $(CH)_m$ mit $m = 0$ oder 1 , vorzugsweise CH, ist;

25

Z in 3- oder 4-Position vorkommt und eine Aminomethyl-, eine Guanidino- oder eine Aminogruppe



ist, wobei R_{14} H, OH, NH, $-COR_{15}$ oder $-COOR_{15}$ ist, wobei R_{15} ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen oder ein substituierter oder unsubstituierter Aryl- oder Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest ist, wobei der Alkylrest vorzugsweise 1 bis 16, insbesondere 1 bis 8, vor allem 1 bis 4 und besonders bevorzugt 1 bis 2 C-Atome und der Aryl- oder Heteroarylrest vorzugsweise 4 bis 14, insbesondere 6 bis 10, vor allem 6 C-Atome und vorzugsweise 1 bis 3 N als Heteroatom besitzt;

dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere geladene Reste vorzugsweise abgeleitet von $-COOH$, $-CH(COOH)_2$, $-SO_2H$, NH_2 , einer Amidino-, Hydroxyamidino-, Amidrazono- oder Guanidinogruppe in den Resten R_1 , R_2 , R_3 oder R_5 vorhanden sind;

oder eine Verbindung der allgemeinen Formel I in Form eines Prodrugs oder in Form ihres Salzes.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei U an 1, 2 oder 3 Positionen vorzugsweise mit einem Halogen, insbesondere Fluor oder Chlor, oder einem Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Methoxy-, Ethoxy-, oder Propoxyrest substituiert ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei eine Carboxylgruppe als Ester, bevorzugt als Ethylester, geschützt vorliegt.

4. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 in Form eines Prodrugs, wobei R_9 und/oder R_{11} in diesem Fall ein Alkylcarbonyl-, Aralkylcarbonyl-, Alkyloxycarbonyl- oder Aralkyloxycarbonyl-Rest ist, wobei der Al-

kylrest vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4 C-Atome und der Arylrest vorzugsweise 5 bis 8, insbesondere 6 C-Atome besitzt.

5. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass im Amidinobenzylamidrest die Amidinogruppe in 4-Position steht und dass A die Aminosäuren Glu — D-Ser bedeutet und dass R₅ ein mit einer Carboxylgruppe versehener Aryl- oder Aralkylsulfonyl-Rest mit 1 bis 16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen im Alkylrest und 6 bis 14, vorzugsweise 6 bis 10, insbesondere 6 C-Atomen im Arylrest ist, der an Glu gebunden ist.
6. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass im Amidinobenzylamidrest die Amidinogruppe in 4-Position steht und dass P2 die Aminosäure D-Ser und P1 eine natürliche oder künstliche, unsubstituierte oder substituierte basische Aminosäure bedeutet, beispielsweise Lys, homoLys, Arg, norArg, homoArg, His, Orn, Orn(2-Imidazoliny), Dab, 4-[(2-Amino)Pyrimidinyl]Buttersäure, Dap, Ala[3-(2-Pyrrolidinyl)], Ala[3-Pyrrolidinyl-(2-N-Amidino)], Ala[3-(N-Piperazine-4-N-amidino)], Ala(4-Pip), Ala[4-Pip(N-amidino)], homoAla(4-Pip), Ala[3-Pip(N-amidino)], homoAla(3-Pip), homoAla[4-Pip(N-amidino)], Ala-(3-guanidino), Phe(3-Amidino), Phe(4-Amidino), Phe(3-NH₂), Phe(4-NH₂), Phe(3-Guanidino), Phe(4-Guanidino), Phe[4-(2-imidazoliny)], Phe[3-CH₂-(guanidino)], Phe[4-CH₂-(guanidino)], homoPhe(3-Amidino), homoPhe(4-Amidino), hPhe(3-NH₂), hPhe(4-NH₂), hPhe(3-Guanidino), hPhe(4-Guanidino), cis-Cha(4-NH₂), trans-Cha(4-NH₂), cis-homoCha(4-NH₂), trans-homoCha(4-NH₂), trans-Cha(4-CH₂NH₂), trans-homoCha(4-CH₂NH₂), und dadurch gekennzeichnet, dass R₅ ein mit einer Sulfonylgruppe versehener Aryl- oder Aralkylsulfonyl-Rest mit 1 bis 16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen im Alkylrest und 6 bis 14, vorzugs-

weise 6 bis 10, insbesondere 6 C-Atomen im Arylrest ist, der an D-Ser gebunden ist.

5 7. Verbindung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass P1 die Aminosäure Lys oder Arg bedeutet.

8. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Substituent am substituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest ein Halogen, vorzugsweise Fluor, Chlor oder Brom, insbesondere Fluor oder Chlor, ist.

15 9. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass sequentiell die entsprechenden Aminosäuren an ein 4-Acetyloxamidinobenzylamin angekoppelt werden, wobei die N-terminale Aminosäure entweder den R₅-Rest bereits trägt oder dieser anschließend daran gebunden wird.

20 10. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 sowie pharmazeutisch geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

25 11. Arzneimittel nach Anspruch 10, wobei das Arzneimittel in Form einer Tablette, eines Dragées, einer Kapsel, eines Pellets, Suppositoriums, einer Lösung, insbesondere einer Injektions- oder Infusionslösung, von Augen-, Nasen und Ohrentropfen, eines Safts, einer Kapsel, einer Emulsion oder Suspension, eines Globuli, Styli, Aerosols, Puders, einer Paste, Creme oder Salbe eingesetzt wird.

12. Verwendung einer Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 oder eines Arzneimittels gemäß einem der Ansprüche 10 oder 11 zur Therapie oder Prophylaxe eines Tumors, insbesondere in oraler, subkutaner, intravenöser oder transdermaler Form.

5

13. Verwendung einer Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 oder eines Arzneimittels gemäß einem der Ansprüche 10 oder 11 zur Diagnose eines Tumors.

Curacyte AG

30. Dezember 2002

C37296B BÖ/Boh

5 Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und Verwendung zur Therapie, Prophylaxe und Diagnose eines Tumors.